



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

고지방 식이로 유도한 비만이  
마우스 간의 철, 구리 및 아연 함량과  
철 흡수 관련 유전자의 발현에  
미치는 영향

Effects of high fat diet-induced obesity  
on the hepatic iron, copper and zinc status and  
the expression of iron absorption-related genes in mouse

2013 년 2 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

임예서

국문초록

고지방식으로 유도한 비만이  
마우스 간의 철, 구리 및 아연 함량과  
철 흡수 관련 유전자의 발현에  
미치는 영향

서울대학교 대학원  
식품영양학과  
임에서

비만은 철 결핍을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 또 다른 2가 양이온인 구리와 아연의 영양상태가 고지방 식으로 유도 비만에 의해 어떠한 영향을 받는지는 명확히 알려져 있지 않다. 또한 비만이 철의 흡수를 어떻게 저해하는지도 명확히 규명되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 고지방 식으로 유도한 비만이 간의 철, 구리 및 아연 함량에 미치는 영향과 철의 흡수를 어떻게 저해시키는지 알아보고자 하였다. 5주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 실험식이에 따라 네 군으로 나누어 12주간 사육하였다. 실험식이는

총 칼로리의 10%를 대두유나 잣기름으로 공급하는 대조 식이(SC, PC)와 총 칼로리의 45% 중 10%는 대두유나 잣기름으로 공급하고 나머지 35%는 라아드로 공급하는 고지방 식이(SHFD, PHFD)로 구성되었다. 고지방 잣기름군은 고지방 대두유군에 비해 유의적으로 낮은 체중증가를 보였다 ( $P < 0.05$ ). 간의 철 농도는 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 낮았다( $P < 0.001$ ). 고지방 잣기름군은 고지방 대두유군에 비해 유의적으로 낮은 체중증가를 보였음에도 불구하고, 간의 철 농도는 유의적 차이를 보이지 않았다. 간의 구리와 아연 농도는 그룹 간 차이를 보이지 않았다. 그러나, 간의 총 구리 함량을 최종 체중으로 보정한 값은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 낮았다. 간의 hepcidin mRNA 수준은 그룹 간 차이를 보이지 않았다. 십이지장의 ferroportin 단백질 발현은 그룹 간 차이를 보이지 않았지만, Duodenal cytochrome b(Dcytb) mRNA 수준은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 낮은 경향을 보였다 ( $P=0.057$ ). 결론적으로, 고지방 식이로 유도한 비만모델에서 간의 철 저장량은 유의적으로 낮았지만, 구리와 아연의 영양상태는 그 영향을 받지 못했다. 또한 고지방 잣기름군에서의 유의적으로 낮은 체중 증가는 철 영양상태의 개선으로 이어지지 못했다. Dcytb 발현 저하는 식이 유도 비만

모델에서 간에서의 철 저장량 감소를 유발시킨 요인으로 사료된다.

## 주요어

비만, 미량 무기질 영양상태, Dcytb, 철 흡수 관련 유전자, 고지방  
식이

학번: 2010-23614

# 목 차

국문 초록 .....	i
목차 .....	iv
표 목차 .....	vi
그림 목차 .....	vii
약어 목록 .....	ix
I. 서론 .....	1
II. 문헌고찰 .....	5
III. 연구방법 .....	21
1. 실험설계 .....	21
2. 실험식이 .....	22
3. 사육 방법 및 시료수집 .....	25
4. 간의 철, 구리 및 아연의 농도 측정 .....	26
5. RNA 추출 및 Real time PCR .....	28
6. Western blot analysis .....	31
7. 통계분석 .....	33
IV. 실험 결과 .....	34
1. 체중 증가량 및 식이 섭취량 .....	34

2. 간의 철 농도-----	37
3. 간의 아연 및 구리 농도 -----	39
4. 고지방 식이로 유도한 비만이 hepcidin 및 ferroportin 발현 에 미치는 영향-----	42
5. 비만이 장세포 내로의 철의 이동에 미치는 영향 -----	45
6. 비만이 장세포에서 혈중으로의 철의 이동에 미치는 영향 -----	47
<b>V. 고찰</b> -----	49
<b>VI. 요약 및 결론</b> -----	57
참고문헌 -----	59
영문초록 -----	66

## 표 목차

Table 1. Composition of the experimental diets-----	23
Table 2. Fatty acid composition of experimental diets -----	24
Table 3. Operating conditions of 210/211VGP atomic absorption spectrophotometer-----	27
Table 4. Primers used for real time PCR analysis -----	30
Table 5. Body weight, weight gain, liver weight , liver weight per gram of body weight and liver TG of mice fed control or HFD diets containing pine nut oil or soybean oil-----	35
Table 6. Daily food and mineral intakes -----	36



## 그림 목차

Figure 1. Role of hepcidin in iron homeostasis -----	11
Figure 2. Proteins involved in regulation of hepatocyte hepcidin production during iron-repleted and iron-deficient conditions-----	14
Figure 3. Transport of iron across the intestinal enterocyte -----	19
Figure 4. Hepatic iron content, total hepatic iron corrected for body weight and the correlation between hepatic iron content and the body weight -----	38
Figure 5. Hepatic copper content expressed as microgram of copper per gram of wet tissue and total hepatic copper corrected for body weight -----	40
Figure 6. Hepatic zinc content expressed as microgram of zinc per gram of wet tissue and total hepatic zinc corrected for body weight -----	41
Figure 7. Hepatic hepcidin mRNA levels and the ratio of hepcidin mRNA to hepatic iron content -----	43
Figure 8. Protein expression of ferroportin -----	44

Figure 9. Dcytb and DMT1 mRNA levels-----46

Figure 10. Duodenal ferroportin and hephaestin mRNA levels -----48

## 약어 목록

BMP6: Bone morphogenetic protein 6

BMPR: Bone morphogenetic protein receptor

CCK: Cholecystokinin

Dcytb: Duodenal cytochrome b

DMT1: Divalent metal transporter 1

HCP-1: Heme carrier protein 1

HJV: Hemojuvelin

HO-1: Heme oxygenase 1

IL-1  $\alpha$ : Interleukin-1  $\alpha$

IL-1  $\beta$ : Interleukin-1  $\beta$

IL-6: Interleukin 6

PAI-1: Plasminogen activator inhibitor 1

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$

## I. 서론

비만은 철 영양상태의 저하를 유발한다고 보고되고 있다. 11 세에서 17 세 학생들을 대상으로 한 연구에서 과체중 및 비만인 학생들은 정상 체중인 학생들에 비해 철 결핍 유병률이 유의적으로 높았다(Moayeri et al. 2006). 비만인 폐경기 여성에서 철 영양 상태 저하가 나타났다(Lecube et al. 2012). 과체중 이거나 비만인 어린이가 6 주간의 체중 감량 프로그램에 참여한 이후 철 영양상태 및 철 흡수율이 유의적으로 개선되었다(Amato et al. 2010). 이러한 선행연구의 결과들은 비만이 철 결핍을 유발하는 주된 요인 중 하나임을 시사한다.

철, 구리 및 아연은 2 가 양이온이라는 점에서 화학적 유사성을 지닌다. 화학적 유사성을 가진 무기질은 수송 단백질이나 일부 흡수 기전을 공유하기 때문에 흡수 될 때 상호작용이 있는 것으로 알려져 있다(Solomons et al. 1981). 그러므로 철, 아연 및 구리의 체 내 항상성이 깨질 경우, 서로 다른 무기질의 체내 흡수와 영양상태에 영향을 미칠 수 있다. 소화기계 질환이 없는 성인들을 대상으로 한 연구에서 25 mg 의 아연을 단독으로 보충한 그룹이 25 mg 의 아연과 50 mg 의 2 가 철을 함께 보충한 그룹에 비해 보충 후 1 시간 간격으로 총

4 시간 동안 측정된 혈청 아연이 측정 후 3 시간 동안 유의적으로 높았다(Solomons et al. 1981). 철의 농도가 10.2 mg/L 인 분유를 섭취한 영아에 비해 철의 농도가 2.5 mg/L 인 분유를 섭취한 영아에서 구리의 흡수 정도가 유의적으로 높았다(Haschke et al. 1986). 이러한 무기질 간 상호작용을 고려할 때, 비만에 의한 철 영양상태의 저하는 구리와 아연의 영양상태 역시 비만에 의해 영향 받을 가능성이 있음을 시사한다. 간의 중성지방 (triglyceride, TG) 함량으로 보정된 간의 구리와 아연 농도는 정상 마우스에 비해 ob/ob 마우스에서 유의적으로 낮았다. 그러나 간의 총 철 함량은 ob/ob 마우스에 비해 정상 마우스에서 유의적으로 낮았다(Kennedy et al. 1986). 이처럼 유전적으로 유도된 비만이 구리와 아연의 영양상태에 미치는 영향은 보고되었지만, 고지방 식이로 유도한 비만모델에서의 연구는 진행되지 않았으며 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Hepcidin 은 철의 항상성을 조절하는 호르몬이다. 이것은 철의 흡수와 저장 철의 이용을 조절함으로써 혈장 철 농도와 철의 체내 분배를 조절한다 (Nemeth et al. 2006). Hepcidin 이 철의 방출 수송체인 ferroportin 에 붙게 되면, 이것을 분해시켜 철이 세포 외로 이동하는 것을 억제하게 된다. Hepcidin 의 합성은 감염

및 염증상태에 의해 촉진된다. 이러한 촉진작용은 주로 염증성 사이토카인 중 하나인 interleukin-6(IL-6)에 의해 매개된다. Hecpidin 의 분비증가는 ferroportin 의 분해를 유도하고, 이것은 염증성 빈혈의 원인이 된다(McClung et al. 2009). Hecpidin 의 발현은 체 내 철 영양상태에 의해서도 조절된다. 마우스에 철 덱스트란 (iron dextran)을 주입하자, 간의 철 농도가 높아지며 hecpidin 의 mRNA 수준은 낮아졌다(Pigeon et al. 2001).

Duodenal cytochrome b(Dcytb)와 Divalent metal transporter 1(DMT1)은 철이 장세포 내로 유입되는데 중요한 역할을 한다. 철이 흡수되기 위해서는 Dcytb 에 의해 3 가 철이 2 가 철로 환원되어야 한다. 환원된 철은 DMT1 에 의해 장세포 내로 유입된다. 체 내 철 요구량이 높을 경우, 장세포 내의 2 가 철은 ferroportin 에 의해 혈중으로 이동하게 된다. ferroportin 에 의해 운반된 2 가 철은 hephaestin 에 의해 3 가 철로 산화되고, 아포 트랜스페린(apo-transferrin)에 붙어 체내 필요한 곳으로 이동하게 된다(Anderson et al. 2009).

한국산 잣기름은 포만 호르몬의 분비를 촉진시켜 식욕을 억제 시킨다고 알려져 있다(Wilrike et al. 2008). 또한 혈중 지질 강하 효과도 가져오는 것으로 보고되고 있다(Pasman et al.

2008). 이러한 잣기름의 이점을 고려할 때, 식이지방 중 일부를 잣기름으로 대체 하였을 때 체중 감소 효과가 유도될 가능성이 있다.

그러므로 본 연구에서는 고지방 식이로 유도한 비만이 간의 철, 구리 및 아연의 함량에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 또한 철의 흡수가 어떠한 기전에 의해 저해되는지 규명하고자 하였다. 잣기름으로 유도된 체중 감소 효과가 비만에 의한 철 영양 상태 저하를 개선시키는지 추가적으로 파악하고자 하였다.

## II. 문헌 고찰

### 비만과 철 결핍

비만은 철 결핍을 유발하는 것으로 보고되고 있다. 11 세에서 17 세 학생들을 대상으로 한 연구에서 과체중 및 비만군이 정상 체중군에 비해 철 결핍 유병률이 유의적으로 높았다(Moayeri et al. 2006). 비만인 폐경기 여성들은 정상체중인 폐경기 여성에 비해 수용성 트랜스페린 수용체(soluble transferrin receptor) 농도가 유의적으로 높았다. 수용성 트랜스페린 수용체 농도는 세포막에 존재하는 트랜스페린 수용체 농도와 비례하므로 세포 내 철 영양상태를 반영한다고 할 수 있다. 체내 철 요구량이 증가하면, 수용성 트랜스페린 수용체의 농도가 높아지므로 비만인 폐경기 여성에서 수용성 트랜스페린 수용체 농도가 유의적으로 높은 것은 비만에 의한 철 결핍 가능성을 보여준다고 할 수 있다(Lecube et al. 2012). 과체중 이거나 비만인 어린이가 6 주간의 체중 감량 프로그램에 참여한 이후, 체질량지수(BMI, Body Mass Index)가 유의적으로 감소하였고, 철 영양상태 및 철 흡수 정도 또한 유의적으로 개선됨을 확인할 수 있었다(Amato et al. 2010).



## 철, 구리 및 아연의 흡수기전 공유 가능성

철, 구리 및 아연은 흡수 시 서로 상호작용하는 것으로 알려져 있다. Solomons (Solomons et al. 1981) 등은 소화기계 질환이 없는 성인들을 대상으로 한 연구에서 25 mg 의 아연을 단독으로 보충한 그룹이 25 mg 의 아연과 50 mg 의 2 가 철을 함께 보충한 그룹에 비해 보충 후 1 시간 간격으로 총 4 시간 동안 측정한 혈청 아연이 측정 후 3 시간 동안 유의적으로 높음을 확인할 수 있었다. 25 mg 의 아연과 50 mg 의 3 가 철을 함께 보충한 그룹 또한 아연을 단독으로 보충한 그룹에 비해 혈청 아연이 유의적으로 낮았지만, 보충 후 4 시간이 지난 시점에서야 비로소 유의적 낮아졌다. 즉, 아연과 2 가 양이온이라는 점에서 화학적으로 유사한 2 가 철이 3 가 철에 비해 아연의 흡수를 저해하는 효과가 큰 것으로 보인다. Haschke (Haschke et al. 1986) 등에 따르면, 철의 농도가 10.2 mg/L 인 분유를 섭취한 영아에 비해 철의 농도가 2.5 mg/L 인 분유를 섭취한 영아에서 구리의 흡수 정도가 유의적으로 높았다. Yadrick (Yadrick et al. 1989) 등은 성인 여성들을 대상으로 한 연구에서 아연을 보충하였을 때, 보충 전에 비해 혈청 페리틴 농도(serum ferritin)와

헤마토크리트(hematocrit) 수치가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

철, 구리 및 아연의 이러한 상호작용은 일부 흡수 경로를 공유하여 나타나는 것으로 알려져 있다. DMT1 은 철뿐만 아니라 구리와 아연의 세포 내로의 이동에도 관여한다. DMT1 은 철을 세포 내로 운반할 때, 수소이온도 함께 이동시킨다. 이로 인해 양이온의 내향전류(positive inward current)가 발생된다. DMT1 을 발현하는 난모세포(oocyte)에 아연과 구리를 처리하였을 때, 양이온 내향전류가 발생되었다. 이는 DMT1 이 두 무기질의 세포 내로의 이동에 관여함을 시사한다(Gunshin et al. 1997; Arredondo et al. 2003). 구리는 철과 DMT1 뿐만 아니라 그 이외의 일부 흡수기전을 공유하는 것으로 알려져 있다. 구리는 철과 마찬가지로 흡수 시 2 가 구리이온이 1 가 구리 이온으로 환원되는 과정이 필요하다. 철의 환원에 관여하는 Dcytb 가 구리의 환원에도 관여하는 것으로 보고되고 있다. Dcytb 유전자를 트랜스펙션 시킨 MDCK cell 은 Dcytb 유전자를 발현하지 않는 MDCK 세포에 비해 철뿐만 아니라 구리의 환원력도 유의적으로 높았다(Wyman et al. 2008). 철이 체내로 흡수되기 위해서는 hephaestin 에 의해 3 가 철로 재산화되는

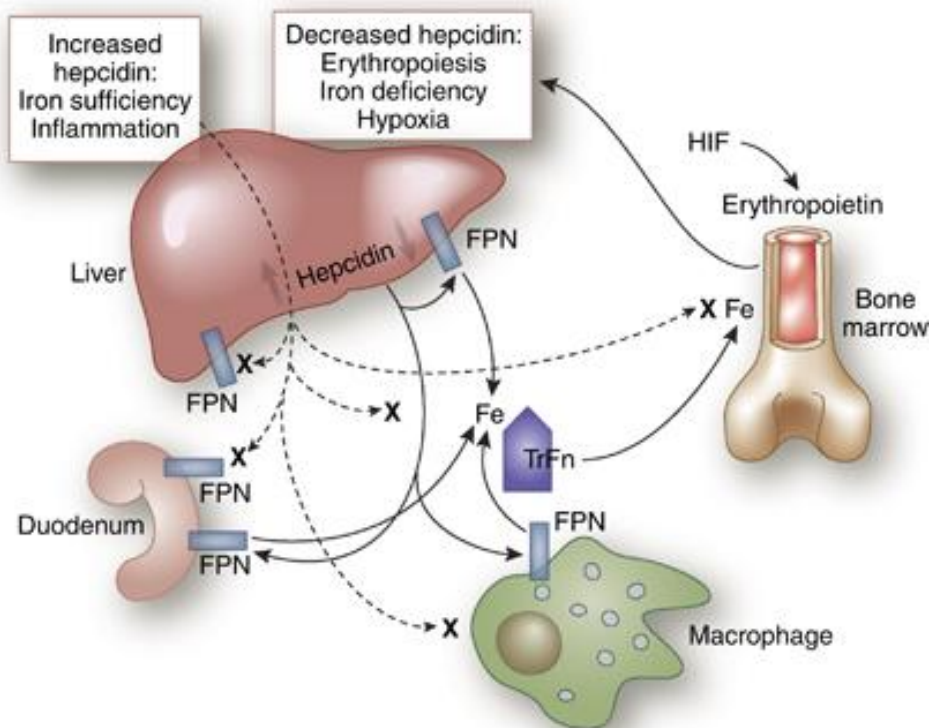
과정이 필요하다. Hephaestin 은 보조인자(cofactor)로 구리를 필요로 하며 구리의 영양상태가 저하되게 되면, 이 효소의 활성은 낮아진다. C57BL/6J 마우스에 철 결핍 식이를 섭취시켰을 때, hephaestin 의 단백질 발현과 그 효소의 활성이 유의적으로 낮았다(Anderson et al. 2002; Chen et al. 2006). 이는 구리의 영양상태 저하가 철의 흡수를 저해시켜 철의 2 차적 결핍을 유발할 수 있음을 보여준다.

## Hepcidin 에 의한 철 항상성 조절

Hepcidin 은 간에서 합성되는 호르몬으로 철 항상성을 유지시키기 위한 주된 조절자(regulator)이다(Nemeth et al. 2006). Hepcidin 은 ferroportin 을 번역 후 과정에서 조절한다. 간에서 합성되어 분비된 hepcidin 이 ferroportin 에 결합하면, 이 단백질은 세포질 내로 내재화(internalization)되어 분해되게 된다. Ferroportin 은 철의 유일한 방출 수송체(exporter)로 세포 밖으로 철을 수송하는 역할을 한다. 그러므로 ferroportin 이 hepcidin 에 의해 분해되어 세포의 기저면(basolateral surface)에 존재하지 않게 되면, 철이 세포 밖으로 이동하지 못해 세포 내에 축적되게 된다. 이것은 세 가지 측면에서 체 내 철 이용을 저해한다. 1) 장세포 내에 존재하는 철이 체내로 흡수되는 것을 억제한다. 2) 대식세포에서 철이 방출되어 재사용되는 것을 억제한다. 3) 철이 주로 저장되는 간에 작용하여 저장 철의 이용을 억제한다(**Figure 1**) (Tussing-Humphreys et al. 2012).

최근에는 hepcidin 이 ferroportin 뿐만 아니라 DMT1 의 발현을 조절함으로써 철의 항상성 조절에 관여한다는 연구결과가 보고되고 있다. Hepcidin 을 처리한 Caco-2/TC7 세포는 처리하지 않은 세포에 비해 DMT1 의 단백질 발현이 유의적으로

낮았다. 이는 hepcidin 이 DMT1 을 유비퀴틴화 (ubiquitination)시켜 단백질의 분해를 유도함으로써 그 발현이 낮아진 것으로 보인다. 또한 C57BL/6J 마우스의 십이지장에서 장점막세포를 분리하여 hepcidin 을 처리했을 때에도 동일한 결과를 보였다(Brasse-Lagnel et al. 2011). Caco-2 세포에 hepcidin 을 처리하였을 때, 세포가 hepcidin 에 노출된 시간이 증가할수록 장의 선단표면 (apical surface)으로의 철의 흡수는 저해됐지만, 장세포의 기저면 (basolateral surface)쪽으로 철의 방출되는 정도는 hepcidin 처리 여부에 따른 유의적 차이를 보이지 않았다. 이는 hepcidin 이 장세포 내로 철이 이동하는 것을 억제하기 보다는 장세포에서 혈액으로 철이 방출되는 것을 저해함을 시사한다. 또한 Brasse-Lagnel et al 의 연구 결과와 마찬가지로 hepcidin 에 의해 DMT1 의 단백질 발현이 유의적으로 낮아졌다(Mena et al. 2008).



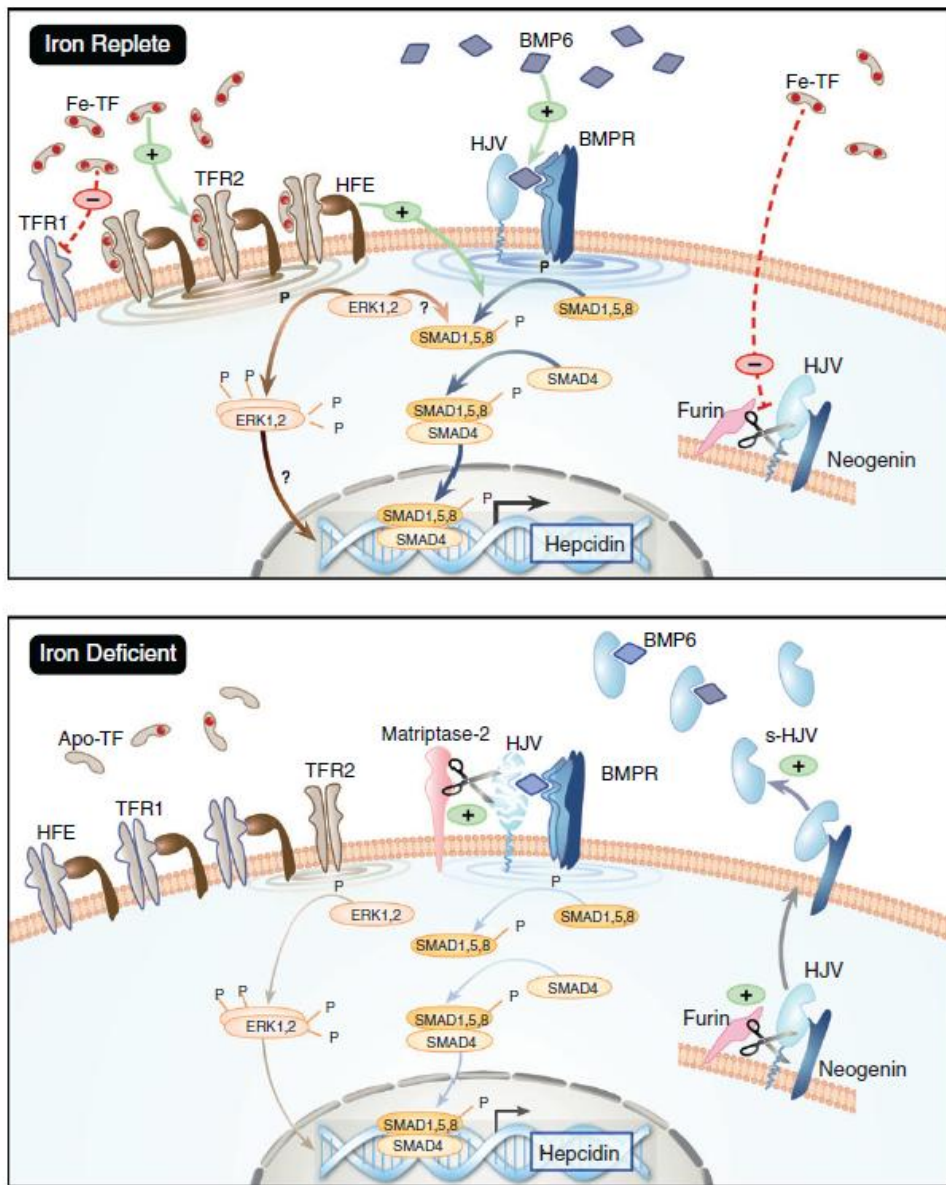
**Figure 1.** Role of hepcidin in iron homeostasis (Coyne 2011)

## Hepcidin 발현 조절

간의 철 농도는 hepcidin mRNA 수준에 영향을 미친다. BALB/cJ 마우스의 실험식이에 철을 보충 하였을 때 hepcidin mRNA 수준이 유의적으로 낮았다. 또한 철의 보충 정도가 증가할수록 간의 철 농도가 증가하였고, 간에서의 hepcidin mRNA 수준 또한 용량 의존적으로 감소하였다(Pigeon et al. 2001). 간의 철 농도에 의한 hepcidin mRNA 수준은 다음과 같은 기전에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 철 과잉 시 bone morphogenetic protein 6 (BMP6)의 발현이 증가한다. BMP6가 bone morphogenetic protein receptor (BMPR)에 결합하면, hepcidin의 전사를 촉진하는 SMAD 신호화 캐스케이드(signaling cascade)가 개시되어 hepcidin mRNA 수준이 높아진다. 반대로 철이 결핍되면, matriptase-2가 BMPR의 보조 수용체(coreceptor)인 hemojuvelin (HJV)을 분해시킴으로써 SMAD 신호화 캐스케이드가 개시되는 것을 저해한다. 또한 철 결핍 시 증가되는 막횡단 단백질 분해효소 furin은 s-HJV를 유리시켜 BMP6와 결합함으로써 BMP6가 BMPR에 결합되는 것을 막는다(**Figure2**) (Knutson 2010).

IL-6 가 IL-6 수용체(receptor)에 붙으면, 세포 내 신호전달물질 중 하나인 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)를 인산화(phosphorylation) 시킨다. 인산화된 STAT3 는 이합체(dimer)를 형성하여 핵 내로 이동한다. 이것은 hepcidin 프로모터(promoter)의 IL-6 반응요소 (IL-6 response element)와 결합하여 hepcidin 유전자의 전사를 촉진시킨다(Fleming 2008). IL-6<sup>-/-</sup>마우스의 복막 대식세포(peritoneal macrophage)를 배양시켰던 50%의 조건배지 (conditioned media)에 IL-6 항체(antibody)를 처리하여 C57BL/6 마우스에서 분리한 간세포를 20 시간 배양시킨 결과, hepcidin 의 발현을 자극하는 IL-6 가 없었음에도 불구하고 여전히 간세포에서 hepcidin 의 발현이 자극됨을 확인할 수 있었다. 이에 hepcidin 발현을 자극하는 또 다른 요인을 파악하기 위해 Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )와 Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 항체를 추가적으로 처리한 결과, 대식세포 조건배지에 의한 hepcidin 발현 촉진 효과가 저해되었다. 이는 IL-6 뿐만 아니라, IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  역시 hepcidin 의 발현을 촉진시키는 요인 중 하나임을 시사한다(Lee et al. 2005).





**Figure 2.** Proteins involved in regulation of hepatocyte hepcidin production during iron- repleted and iron-deficient conditions (Knutson 2010)

## 염증성 빈혈 (Anemia of inflammation)

염증성 빈혈은 흔히 결핵, 만성 진균증과 같은 만성 감염, 류마티스 관절염 및 국소성 소장염 등의 만성질환에서 동반된다. 철의 흡수와 저장 철의 이용이 억제됨으로써 적혈구 전구세포가 이용할 수 있는 철이 제한되어 저철혈증이 나타나는 것을 특징으로 한다. 철 결핍성 빈혈의 경우, 혈청 페리틴(serum ferritin)이 정상 수치 이하로 감소하는 경향을 보이지만, 염증성 빈혈은 염증과 대식세포의 철 축적이 페리틴 합성을 촉진시켜 혈청 페리틴이 정상 수준 이상으로 증가하는 경향을 보인다. 또한 염증에 의해 체 내 철 이용이 억제되고 있어 단순한 철 보충으로 증상이 개선되지 않는다(Ganz et al. 2009). 만성염증상태에서 염증성 사이토카인의 분비가 높아지게 되면, 이것은 hepcidin의 과잉 생산을 유발시켜 염증성 빈혈의 원인으로 작용한다. Heparin은 세포의 철 방출 수송 단백질인 ferroportin을 분해시켜 장세포, 대식세포 및 간세포에서 철이 방출되는 것을 억제하여 적혈구 생성에 이용될 수 있는 철을 세포 내에 고립시켜 빈혈을 유발시킨다.

비만은 낮은 수준의 전신성 염증을 유도하는 것으로 알려져 있다. 비만상태에서 지방세포는  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 및 PAI-1

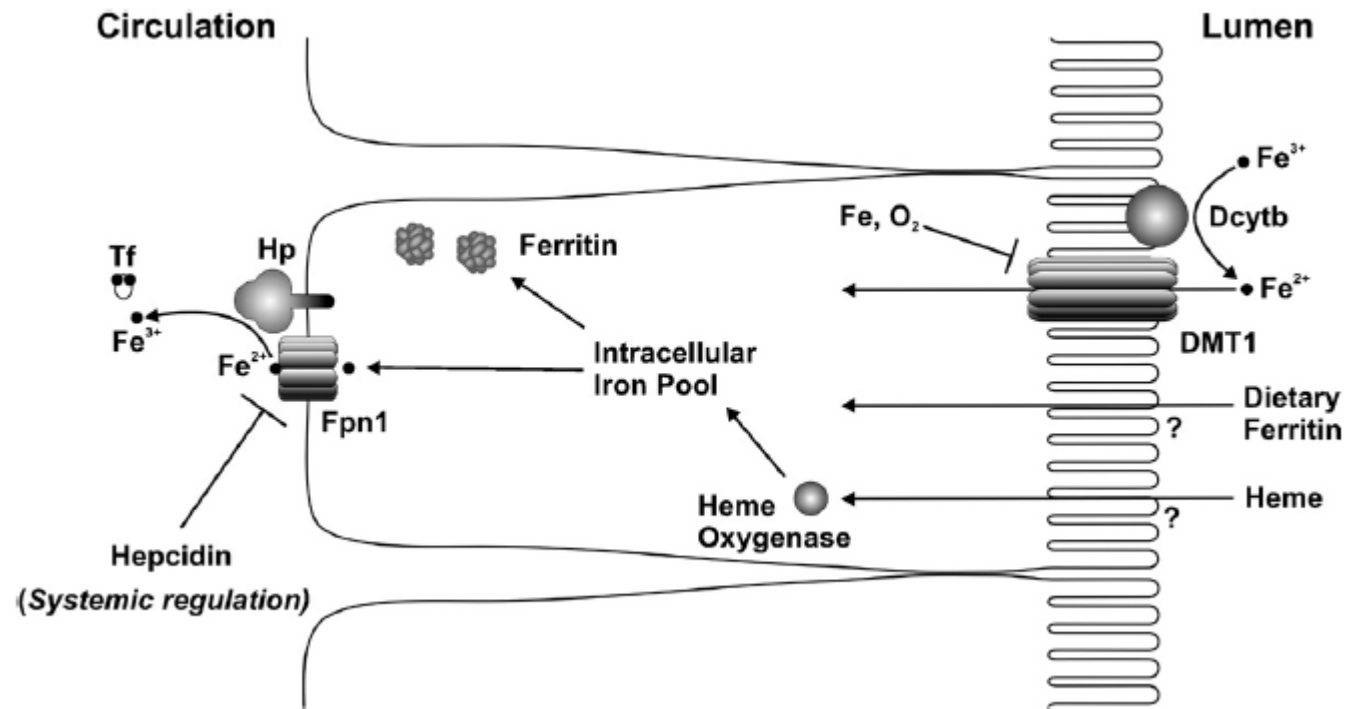
등의 아디포사이토카인(adipocytokine)을 과도하게 분비한다. 이는 비만을 비롯한 비만관련 대사질환인 당뇨병, 동맥경화 등의 원인이 되는 것으로 알려지고 있다(OUCHI et al. 2012). Hepcidin 은 비만에서의 철 영양상태 저하를 설명할 수 있는 연결고리로 거론되고 있다. 비만에 의해 유도되는 만성 염증상태가 hepcidin 의 분비를 촉진시키고, 이것이 궁극적으로 철의 흡수를 저해하여 철 영양상태를 저하 시킬 가능성이 있기 때문이다(McClung et al. 2009).

## 철의 흡수 기전

식품 중의 철은 헴철 또는 비헴철의 형태로 존재한다. 비헴철의 흡수과정은 다음과 같다. 식품 내에 함유되어 있는 대부분의 비헴철은 3 가 철 이온 상태로 존재한다. 철이 장세포 내로 운반되기 위해서는 3 가 철 이온이 2 가 철 이온으로 환원되는 과정이 필요하다. 장세포의 솔가장자리막(brush border membrane)에 존재하는 Dcytb 가 이러한 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 환원된 철은 수송단백질인 DMT1 에 의해 장세포 내로 들어온다. 장세포 내로 들어온 철은 체내 철 요구량에 따라 혈액으로 이동하거나 장세포에 남게 된다. 체내 철 요구량이 낮으면 철은 페리틴의 형태로 장세포에 저장되게 된다. 페리틴의 형태로 저장되어 있는 철이 장세포의 수명이 다할 때까지 이용되지 않을 경우, 장세포가 노쇠하여 떨어져 나갈 때 대변을 통해 함께 배설되게 된다. 이에 반해 체내 철 요구량이 높을 경우, 철은 장세포의 기저측면막(basolateral membrane)에 존재하는 철의 방출 수송체(exporter)인 ferroportin 에 의해 혈액으로 이동하게 된다. Ferroportin 에 의해 운반된 철이 체내 필요한 곳으로 이동하기 위해서는 철이 아포트랜스페린(apo-transferrin)에 결합해야 한다. 이 과정이 이루어지기 위해서는

ferroportin 에 의해 운반된 2 가 철 이온이 3 가 철 이온으로 재산화되는 과정이 필요하다. 이러한 철의 산화 과정은 ferroportin 과 인접한 곳에 위치하는 hephaestin 에 의해 매개된다(Mackenzie et al. 2005; Wang et al. 2011).

헴철의 흡수 기전은 비헴철에 비해 명확히 알려져 있지 않다. 최근 연구에 따르면, heme carrier protein1 (HCP1)이 장세포 내로 헴철이 유입되는데 관여한다고 알려져 있다. 하지만 이 수송 단백질은 헴철보다는 엽산을 효율적으로 운반하는 것으로 보고되고 있으며, 이것이 실질적으로 체내에서 헴철의 수송단백질로 작용하는지에 대해서는 규명되지 않았다 (Anderson et al. 2009). Haem oxygenase1 (HO-1)은 장세포 내로 들어온 헴철로부터 2 가 철 이온을 유리시킨다. 유리된 2 가 철 이온은 앞서 언급한 비헴철과 같은 경로에 의해 체내로 흡수된다.



**Figure 3.** Transport of iron across the intestinal enterocyte (Fuqua et al. 2012)

## 잣기름의 식욕억제 및 혈중 지질 강하 효과

잣기름은 불포화지방산의 구성비율이 높으며 15% 이상의 피놀렌산(pinolenic acid)를 함유하고 있다. 이러한 잣기름의 특이적 지방산 조성은 식욕 억제 및 혈중 지질 강하 효과에 영향을 미친다고 보고되고 있다.

STC 세포에 한국산 잣기름 지방산을 처리했을 때, 다른 다가 불포화 지방산인 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid) 및 알파 리놀렌산( $\alpha$ -linolenic acid)을 처리 했을 때에 비해 포만 호르몬(satiety hormone) 중 하나인 cholecystokinin (CCK)의 분비가 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 과체중인 폐경기 여성에게 3g 의 잣기름 지방산이나 잣기름 중성지방을 보충했을 때, 올리브유를 보충한 위약군(placebo) 에 비해 CCK 분비가 유의적으로 높았다(Pasman et al. 2008).

랫트의 실험식이에 잣기름을 보충한 군은 피놀렌산을 올레산으로 대체한 것 이외에는 지방산 조성이 동일한 기름을 보충한 대조군에 비해 혈청 중성지방, 초저밀도 지단백(VLDL)의 중성지방 및 콜레스테롤이 유의적으로 낮았다(Asset et al. 1999).

### Ⅲ. 연구 방법

#### 1. 실험설계

5주령의 수컷 마우스(C57BL/6 mouse) 44마리를 중앙 실험 동물 (Seoul, Korea)로부터 구입하여, 서울대학교 수의과대학 동물 사육장에서 사육하였다. 실험 동물의 구입과 사육의 전 과정은 서울대학교 동물실험 윤리위원회 (Seoul National University Institutional Animal Care and Use Committee; SNU IACUC)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다 (승인번호: SNU-101029-1).

실험동물은 3일간 chow diet로 적응시킨 후, 체중에 따라 각 군 당 11마리씩 임의 배치하여 대두유 대조군 (SC), 잣기름 대조군(PC), 고지방 대두유군(SHFD), 고지방 잣기름군(PHFD)으로 나누었다.



## 2. 실험 식이

실험 식이 조성은 AIN-76A를 기본으로 하였으며, 식이 지방 함량과 급원에 따라 4가지 종류의 식이로 제조하여 12주간 공급하였다 (Table1). 대조군은 10% kcal를 지방으로 얻으며, 지방 급원을 각각 대두유(SC: 10% kcal 대두유)와 잣기름(PC: 10% kcal 잣기름)으로 달리하였다. 고지방 식이군은 45% kcal를 지방으로부터 얻으며, 이 중 10% kcal를 대두유 (SHFD: 10% kcal 대두유 + 35% kcal 라아드)와 잣기름(PHFD: 10% kcal 잣기름 + 35% kcal 라아드)으로 대체하였다. 식이 지방의 급원으로 사용된 대두유와 잣기름의 지방산 조성은 Table2에 제시하였다. 식이 지방의 급원으로 이용된 잣기름은 두바이오 주식회사 (GyeongGi-do, Korea)로부터 공급받았다.

**Table 1.** Composition of the experimental diets

	Control (g) (10% kcal Fat)	High-fat (g) (45% kcal Fat)
	10% Oil	10% Oil +35% Lard
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Sucrose	350	172.8
Cornstarch	315	72.8
Dyetrose	35	100
Pine nut oil <sup>a</sup> or Soybean oil	45	45
Lard	0	157.5
t-Butylhydroquinone	0.009	0.009
Cellulose	50	50
Mineral Mix <sup>b</sup>	35	35
Vitamin Mix <sup>c</sup>	10	10
Choline Bitartrate	2	2
Total	1045.0	848.1
kcal/g diet	3.69	4.64

Resource: Dyets, Inc, Bethlehem, PA, USA.

<sup>a</sup> Pine nut oil was gifted from DubioCo., Ltd. (GyeongGi-do, Korea)

<sup>b</sup> 35 grams of mineral mix (Research Diets, Inc, New Brunswick, NJ, USA, S10026) provides 1.0g sodium, 1.6g chloride, 0.5g magnesium, 0.33g sulfur, 59mg manganese, 45mg iron, 29mg zinc, 6mg copper, 2mg chromium, 1.6mg molybdenum, 0.16mg selenium, 0.9mg fluoride, 0.2mg iodine and 3.99g sucrose.

<sup>c</sup> Ten grams of vitamin mix (Research Diets, Inc, V10001) provides 4000IU vitamin A, 1000IU vitamin D<sub>3</sub>, 50IU vitamin E, 30mg niacin, 16mg pantothenic acid, 7mg vitamin B<sub>6</sub>, 6mg vitamin B<sub>1</sub>, 6mg vitamin B<sub>2</sub>, 2mg folic acid, 0.5mg menadione, 0.2mg biotin, 10ug vitamin B<sub>12</sub> and 9.78g sucros

**Table 2.** Fatty acid composition of experimental diets (% of fat)

	Soybean oil		Pine nut oil	
	Control	High-fat	Control	High-fat
Myristic acid (C14:0)	.	0.9	.	0.9
Palmitic acid (C16:0)	11.9	18.9	7.0	17.8
Stearic acid (C18:0)	4.8	11.1	3.6	10.7
Total single free fatty acid	16.7	30.9	10.6	29.4
Palmitoleic acid (C16:1 $\Delta$ 9)	.	1.4	.	1.4
Oleic acid (C 18: :1 $\Delta$ 9)	21.1	34.7	27.4	36.0
Total mono-unsaturated free fatty acid	21.1	36.1	27.4	37.4
Linoleic acid (C18:2 $\Delta$ 9,12)	54.9	30.3	47.2	28.6
$\alpha$ -linolenic acid (C18:3 $\Delta$ 9,12,15)	7.4	2.8	0.8	1.3
Pinolenic acid (C18:3 $\Delta$ 5,9,12)	.	.	14.0	3.3
Total poly-unsaturated free fatty acid	62.3	33.1	62	33.2

Total lipids were extracted from powdered diet according to Folch et al. Extracted lipids were saponified with NaOH in methanol and then methylated in the presence of BF<sub>3</sub> in methanol at 100°C. Fatty acid methyl esters were extracted with hexane and 1  $\mu$ l aliquots of the extracts were injected in to a GC (Agilant 7890A; Agilent, Santa Clara, CA) equipped with a flame ionization detector. The sample was injected in the split mode (1:10) and helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.5ml/min. Capillary column used was a DB-carbowax (0.32mm x 25m, 0.2 $\mu$ m) (Agilent). The oven temperature was increased from 50°C to 220°C at a rate of 15°C/min and held at maximum temperature for 20 min.

### 3. 사육 방법 및 시료 수집

실험 동물은 한 마리씩 분리하여 사육하였다. 실험 식이와 식수는 자유 급여법(*ad libitum*)으로 하였으며, 사육실의 환경은 온도  $23\pm3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm10\%$ 로 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 (7:00 a.m. - 7:00 p.m.) 조절하였다. 실험 기간 동안 식이 섭취량은 일주일에 3번씩 측정하였으며 체중은 일주일에 1번씩 측정하였다.

실험동물을 12시간 절식 시킨 후  $\text{CO}_2$  가스를 흡입시켜 희생시키고, 간과 십이지장 조직을 적출하였다. 분리한 시료는 액체 질소로 즉시 동결시켜 분석 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.

#### 4. 간의 철, 구리 및 아연의 농도 측정

실험 기구에 오염되어 있는 무기질을 제거하기 위해 실험에 사용되는 모든 유리기구는 12시간 이상 8N HNO<sub>3</sub>에 담갔다가 3차 증류수로 세척하여 사용하였다. 간의 철, 구리 및 아연을 분석하기 위하여 일정량의 간 조직을 취하여 16N HNO<sub>3</sub> 5ml을 가하였다. 그 후 60℃에서 5시간 동안 가열 처리하여 간 조직을 회화시켰다(Amato et al. 2010). 0.1N HNO<sub>3</sub>로 희석된 샘플 내의 각 무기질의 농도는 210/211 VGP atomic spectrophotometer (Buck Scientific Inc, Norwalk, OH, USA)를 이용하여 분석되었다. 철, 구리 및 아연 농도의 측정 조건은 Table 3과 같다.

**Table 3.** Operating conditions of 210/211 VGP atomic absorption spectrophotometer.

Element	Detection wave length (nm)	Lamp current (mA)	Slit width (nm)
Fe	248.3	6	0.2
Cu	324.7	4	0.7
Zn	213.9	5	0.7

## 5. RNA 추출 및 Real time PCR

Real time PCR을 이용하여 mRNA 수준을 측정하기 위해 간과 십이지장에서 다음과 같은 방법으로 total RNA를 추출하였다. 일정량의 간과 십이지장을 취하여 Trizol reagent (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA)에 넣고 homogenizer를 이용하여 균질화 시켰다. 이를 상온에서 5분간 방치 한 후, 200 $\mu$ l의 chloroform을 첨가하고 15초간 흔들었다. 4 $^{\circ}$ C, 12,000g에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 다른 tube에 옮겨 500 $\mu$ l의 isopropanol을 첨가하였다. 상온에서 10분간 방치 후 4 $^{\circ}$ C, 12000g에서 10분간 원심분리 하여 RNA 침전물을 얻었다. 침전물에 1ml의 75% ethanol을 첨가하고 4 $^{\circ}$ C, 7500g에서 10분간 원심분리 하여 침전물을 건조시켜 삼차 증류수에 녹였다. 분리된 total RNA는 농도와 순도를 측정하고, 전기영동을 통해 RNA 분해 여부를 확인 한 후, cDNA 합성 전까지 -80 $^{\circ}$ C에서 냉동보관 하였다.

Total RNA 2 $\mu$ g을 PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa bio Inc, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 역전사하였다. cDNA, primer 및 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa bio Inc.)를 혼합한 뒤, Step One<sup>TM</sup> Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Inc., Foster city, CA, USA)을

이용하여 mRNA 수준을 분석하였다. Real time PCR 조건은 다음과 같다. 95℃에서 30초간 predenaturation시킨 후, 95℃에서 5초간 denaturaton, 60℃ 30초간 annealing과 extension 과정을 40회 시행하여 목적 DNA를 증폭시켰다. Real time PCR에 사용된 primer는 **Table 4**에 나타내었다(Dupic et al. 2002; Vokurka et al. 2006).



**Table 4.** Primers used for real time PCR analysis

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Hepcidin	TTGCGATACCAATGCAGAAGA	GATGTGGCTCTAGGCTATGTT
Dcytb	GCAGCGGGCTCGAGTTTA	TTCCAGGTCCATGGCAGTCT
DMT1	GGCTTTCTTATGAGCATTGCCTA	GGAGCACCCAGAGCAGCTTA
ferroportin	TTGCAGGAGTCATTGCTGCTA	TGGAGTTCTGCACACCATTGAT
Hephaestin	TTGTCTCATGAAGAACATTACAGCAC	CATATGGCAATCAAAGCAGAAGA
$\beta$ -actin	ACCCACACTGTGCCCATCTA	CACGCTCGGTCAGGATCTTC

## 6. Western blot analysis

십이지장과 간의 ferroportin 단백질 발현 수준을 western blot analysis를 통해 분석하였다. 일정량의 십이지장과 간을 취하여 RIPA 완충액에 넣고 균질화 용해 시켰다. 균질화시킨 조직을 4°C, 12000rpm에서 20분간 원심분리 한 후, 상층액을 분리하여 수집하였다.

단백질 농도는 Bradford method를 이용하여 정량 하였다. Protein assay reagent(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 600nm에서 흡광도를 측정하였으며, 소 혈청 알부민을 표준 시료로 사용하였다.

각각의 단백질을 30 $\mu$ g이 되게 분주하여 SDS sample buffer(5%  $\beta$ -mercaptoethanol, sodium dodecyl sulfate [SDS], 25% glycerol, 62.5mM Tris-HCl, pH6.8, 0.01% bromophenol blue)와 섞어 10% SDS polyacrylamide gel에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. gel을 전기적으로 PVDF membrane에 옮긴 다음 이를 immunoblot에 사용하였다. 전기영동된 membrane에 5% 탈지분유가 함유된 TBST(Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween-20, pH7.6)를 1시간 동안 처리하여 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. 1차항체인 Rabbit anti-

mouse MTP1 (Alpha Diagnostics International, San Antonio, TX, USA)을 1:1000으로 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 1차 항체를 제거한 후 TBST 용액으로 5분씩 세 번 세척하고 2차 항체인 anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 1:1000으로 희석하여 실온에서 한 시간 동안 반응시켰다. ECL 용액 (Bionote, Korea)을 1:1로 섞어 membrane을 발광시킨 후 X-ray film에 노출하여 밴드를 얻었다. Western blot을 통해 얻은 밴드의 밀도는 Gel Doc XR system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 측정하였다.

## 7. 통계분석

모든 결과는 평균  $\pm$  표준오차 (mean  $\pm$  SEM)로 나타내었다. 지방함량, 지방 급원 그리고 두 요인의 상호작용 효과를 검증하기 위해 이원분산분석 (two-way ANOVA)을 실시하였고, 그룹 간 비교는 LSD multiple comparison test로  $P < 0.05$  수준에서 검증하였다. 변수의 분포가 모수검정을 위한 조건을 충족하지 않을 경우, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney  $U$  test를 이용하여 그룹 간 차이를 살펴보았다. 또한 여러 결과 간의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient를 이용하여 검증하였다. 모든 실험결과는 IBM SPSS Statistics 19.0 프로그램을 이용하여 통계 처리 하였다.

## IV. 실험 결과

### 1. 체중 증가량 및 식이 섭취량

실험식이를 12주 동안 섭취한 C57BL/6 마우스의 체중 및 체중 증가, 간의 무게 및 간의 triglyceride(TG)농도는 Table 5에 제시하였다. 초기 체중은 모든 군에서 유의적 차이가 없었으나, 최종체중과 평균 체중 증가량은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 높게 나타났다. 고지방 식이군 내에서는 대두유군에 비해 잣기름군에서 최종 체중과 체중 증가량이 유의적으로 낮았다. 이에 비해, 대조군 내에서는 지방 급원에 따른 군 간 최종 체중과 체중 증가량이 차이를 보이지 않았다.

식이 섭취량은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 적었다. 철, 구리 및 아연의 섭취량은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 많았다 (Table 6).

**Table 5.** Body weight, weight gain, liver weight , liver weight per gram of body weight and liver TG of mice fed control or HFD diets containing pine nut oil or soybean oil

	Control		High-fat		<i>P</i> value		
	SC (n=10)	PC (n=11)	SHFD (n=11)	PHFD (n=11)	Fat amount	Oil type	Interaction
Body weight at 0wk(g)	17.30±0.51	16.74±0.45	17.01±0.36	17.04±0.34	0.97	0.56	0.50
Body weight at 12wk(g)	32.48±0.96 <sup>ab</sup>	30.51±0.64 <sup>a</sup>	38.49±1.45 <sup>c</sup>	34.58±1.42 <sup>b</sup>	0.00	0.01	0.50
Body weight gain(g)	15.48±0.84 <sup>ab</sup>	13.76±0.59 <sup>a</sup>	21.48±1.42 <sup>c</sup>	17.53±1.31 <sup>b</sup>	0.00	0.01	0.32
Liver weight (g)	1.18±0.04 <sup>b</sup>	1.09±0.03 <sup>ab</sup>	1.21±0.06 <sup>b</sup>	1.01±0.04 <sup>a</sup>	0.55	0.00	0.29
Liver weight per gram of body weight (g/g body weight)	0.38±0.00 <sup>b</sup>	0.38±0.00 <sup>a</sup>	0.33±0.00 <sup>a</sup>	0.31±0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.26	0.18
Liver TG (mg/g tissue)	29.25±2.26	31.43±2.84	39.50±1.91	29.26±1.98 <sup>**</sup>	0.08	0.09	0.01

Values are presented as means ± SEMs. Two-way ANOVA was used to determine the significance effect of fat amount and fat type. For comparison among groups, one way ANOVA analysis with LSD post-hoc test was performed and different letters indicate statistical significance ( $P < 0.05$ ). Student's *t* test was used for comparison between PC and SC or PHFD and SHFD groups if the interaction was significant (\*\*,  $P < 0.01$ ).

**Table 6.** Daily food and mineral intakes

	Control		High-fat		<i>P</i> value		
	SC (n=10)	PC (n=11)	SHFD (n=11)	PHFD (n=11)	Fat amount	Oil type	Interaction
Daily food intake (g/day)	3.20±0.06 <sup>b</sup>	3.20±0.03 <sup>b</sup>	2.82±0.05 <sup>a</sup>	2.76±0.04 <sup>a</sup>	0.00	0.54	0.48
Daily energy intake (kcal)	11.80±0.21 <sup>a</sup>	11.82±0.11 <sup>a</sup>	13.11±0.22 <sup>b</sup>	12.82±0.20 <sup>b</sup>	0.00	0.50	0.43
Daily Fe intake (μg/day)	130.09±2.32 <sup>a</sup>	130.34±1.24 <sup>a</sup>	141.39±2.41 <sup>b</sup>	138.32±2.20 <sup>b</sup>	0.00	0.50	0.43
Daily Cu intake (μg/day)	18.36±0.33 <sup>a</sup>	18.40±0.17 <sup>a</sup>	19.95±0.34 <sup>b</sup>	19.52±0.31 <sup>b</sup>	0.00	0.50	0.43
Daily Zn intake (μg/day)	77.06±1.37 <sup>a</sup>	77.20±0.73 <sup>a</sup>	83.80±1.43 <sup>b</sup>	81.98±1.30 <sup>b</sup>	0.00	0.50	0.43

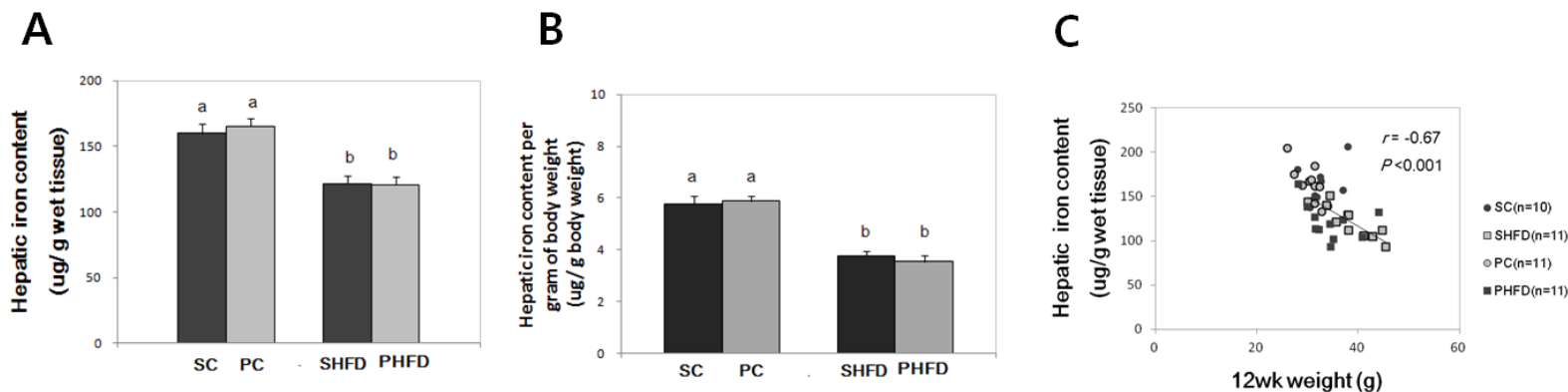
Values are presented as means ± SEMs. Two-way ANOVA was used to determine the significance effect of fat amount and fat type. For comparison among groups, one way ANOVA analysis with LSD post-hoc test was performed and different letters indicate statistical significance ( $P < 0.05$ ).

## 2. 간의 철 농도

간의 철 저장량은 체내 철 영양상태를 가장 잘 반영한다. 비만에 의한 철 영양 상태 저하 여부와 잣기름에 의한 체중 감소 효과가 철 영양상태를 개선 시킬 수 있는지 확인하기 위해 간에서 철 농도를 측정하였다.

간의 철 농도는 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 낮았다 (Figure 4A). 고지방 식이군은 대조군에 비해 간의 저장 철이 약 25% 정도 낮았다. 그러나 간의 철 농도는 지방 급원에 따른 그룹 간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 간의 총 철 함량을 최종 체중으로 보정한 값은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 낮았고, 지방급원에 따른 군간 차이는 보이지 않았다 (Figure 4B). 간의 철 농도와 최종 체중은 비교적 강한 음의 상관관계를 보였다 (Figure 4C).





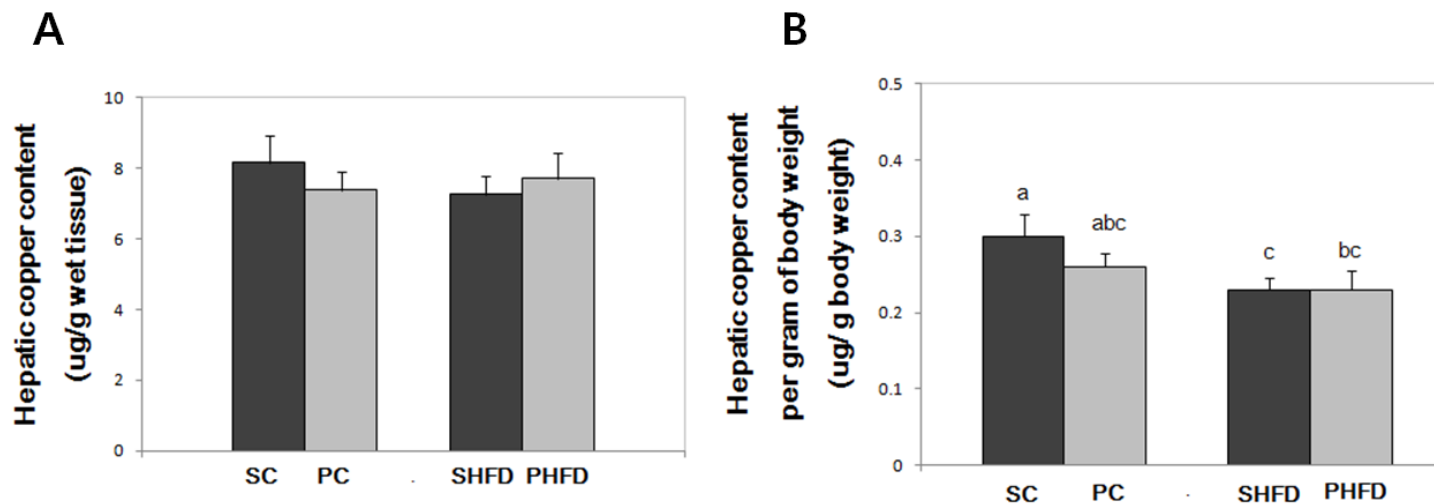
Fat amount ( <i>P</i> value)	0.00	0.00	N/A
Oil type ( <i>P</i> value)	0.73	0.79	N/A
Interaction ( <i>P</i> value)	0.60	0.45	N/A

**Figure 4.** Hepatic iron content expressed as microgram of iron per gram of wet tissue (A), total hepatic iron corrected for body weight (B) in mice fed control or high fat diets containing pine nut oil or soybean oil. Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and oil type and was followed by an LSD post-hoc test. Different letters indicate statistical significance ( $P < 0.01$ ). The correlation between hepatic iron content and body weight (C). The Pearson correlation was  $r = -0.67$ ;  $P < 0.001$

### 3. 간의 아연 및 구리 농도

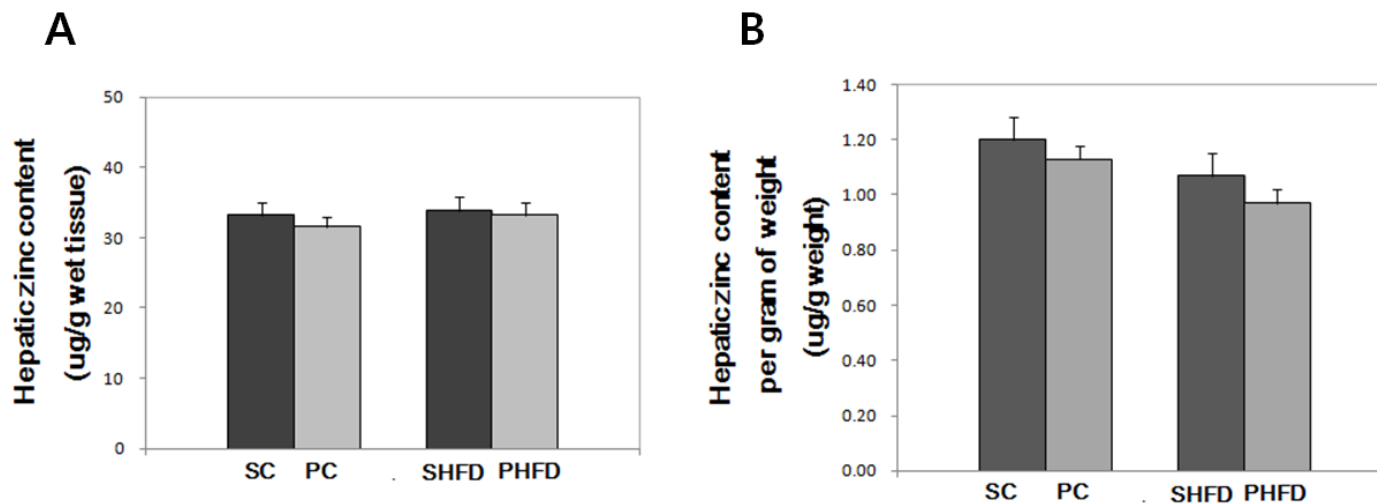
철은 흡수 시 또 다른 2 가 양이온인 구리, 아연과 일부 흡수 경로를 공유하는 것으로 알려져 있다. 따라서 비만이 철의 흡수에 영향을 미친다면, 아연과 구리의 흡수 역시 영향을 받을 가능성이 있다. 이를 검증하기 위해 간에서 아연과 구리의 농도를 측정하였다.

간의 구리 농도는 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않았다 (Figure 5A). 그러나 간의 총 구리 함량을 최종 체중으로 보정한 값은 대조군에 비해 고지방식이군에서 유의적으로 낮았다 (Figure 5B). 간의 아연 농도와 간의 총 아연 함량을 최종 체중으로 보정한 값은 그룹 간 차이를 보이지 않았다 (Figure 6).



Fat amount ( <i>P</i> value)	0.66	0.01
Oil type ( <i>P</i> value)	0.80	0.65
Interaction ( <i>P</i> value)	0.35	0.42

**Figure 5.** Hepatic copper content expressed as microgram of copper per gram of wet tissue (A), total hepatic copper corrected for body weight (B) in mice fed control or high fat diets containing pine nut oil or soybean oil. Statistical difference was determined by Two-way ANOVA. Different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$  by Fisher's LSD multiple comparison test.



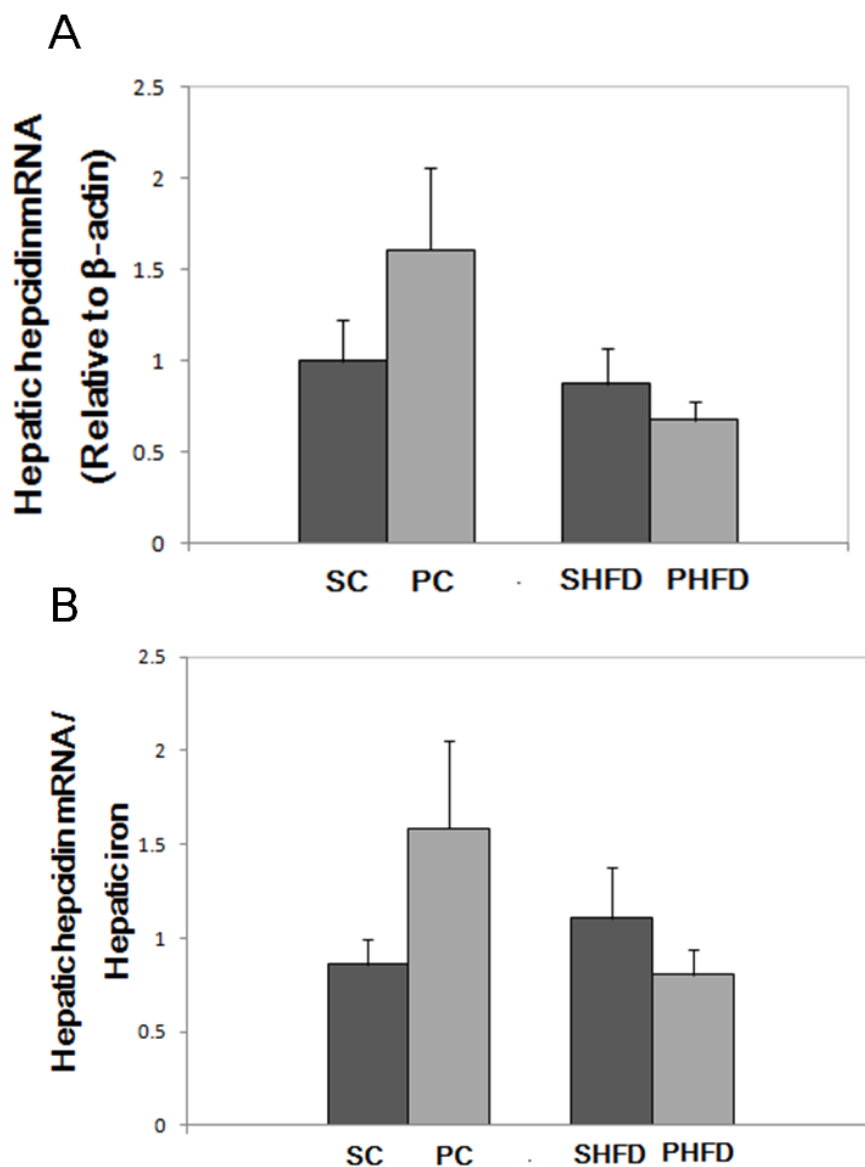
Fat amount ( <i>P</i> value)	0.52	0.08
Oil type ( <i>P</i> value)	0.52	0.28
Interaction ( <i>P</i> value)	0.80	0.90

**Figure 6.** Hepatic zinc content expressed as microgram of zinc per gram of wet tissue (A), and total hepatic zinc corrected for body weight (B) in mice fed control or high fat diets containing pine nut oil or soybean oil. Statistical difference was determined by Two-way ANOVA. Different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$  by Fisher's LSD multiple comparison test.

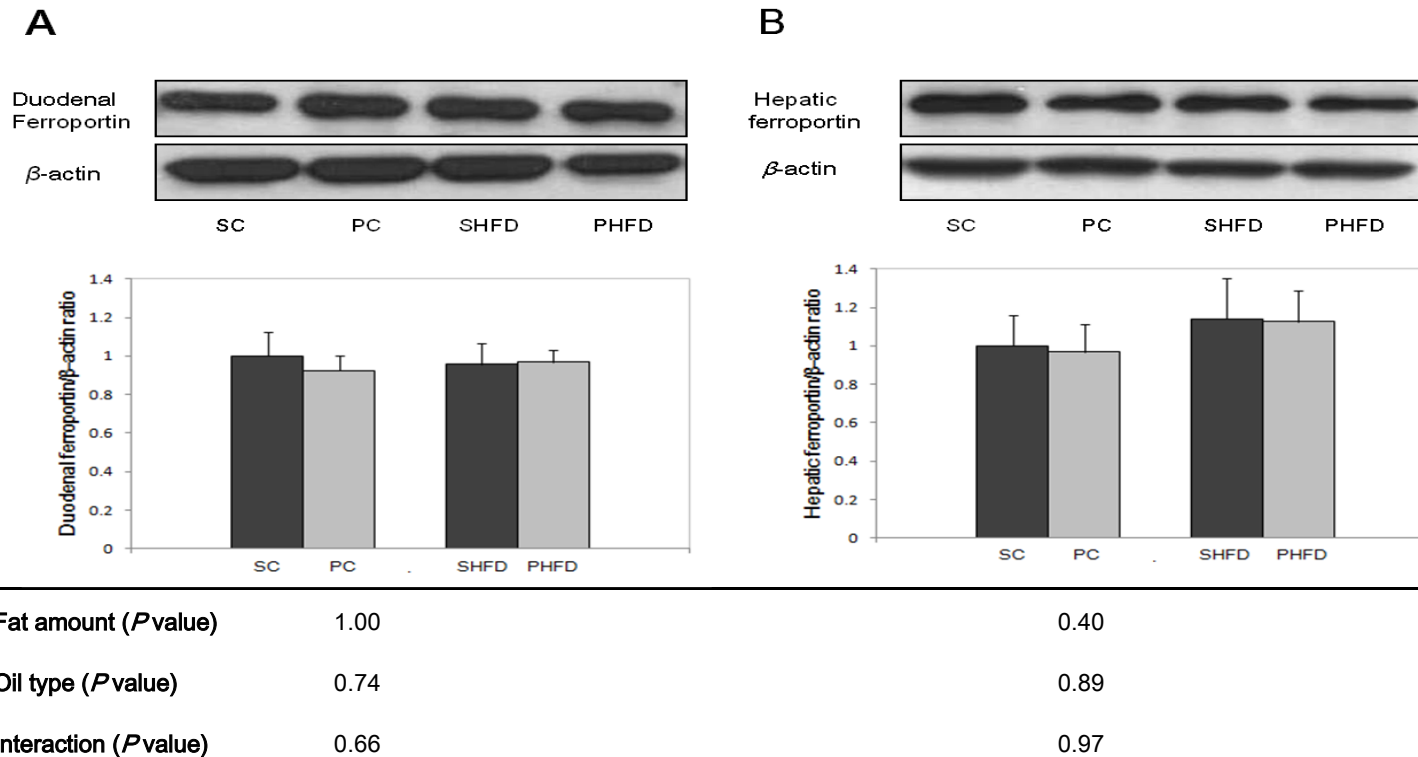
#### 4. 고지방 식이로 유도한 비만이 hepcidin 및 ferroportin 발현에 미치는 영향

Hepcidin 은 철의 항상성에 관여하는 호르몬이다. Hepcidin 의 발현 변화는 철의 흡수에 영향을 미치므로 고지방 식이군에서 hepcidin mRNA 수준이 높아지면, 철의 흡수를 저해시킬 것이라 가정하였다. 이 가설을 검증하기 위해 간에서 hepcidin mRNA 수준을 측정하였으며, 이 hepcidin 에 의해 번역 후 과정에서 조절되는 ferroportin 의 단백질 발현량 또한 간과 십이지장에서 측정하였다.

간에서의 hepcidin mRNA 수준은 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않았다(**Figure 7A**). 또한 hepcidin mRNA 수준을 간의 철 농도로 보정한 값 역시 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않았다 (**Figure 7B**). hepcidin 에 의해 번역 후 과정에서 조절되는 간과 십이지장의 ferroportin 단백질의 발현 역시 그룹 간 차이를 보이지 않았다(**Figure 8**).



**Figure 7.** Hepatic hepcidin mRNA levels (A). Values represent the relative amount of hepcidin mRNA compared to  $\beta$ -actin mRNA. The ratio of hepcidin mRNA to hepatic iron content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) in mice fed control or high fat diets containing pine nut oil or soybean oil (B). Statistical difference was determined by Kruskal wallis test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6 per group).



**Figure 8.** Protein expression of ferroportin in duodenum (A) and liver (B) of mice fed control or high fat diets containing pine nut oil or soybean oil. Ferroportin expression was normalized for  $\beta$ -actin. Statistical difference was determined by Two-way ANOVA. Values are expressed as means  $\pm$  SEM (n=4 to 5 per group).

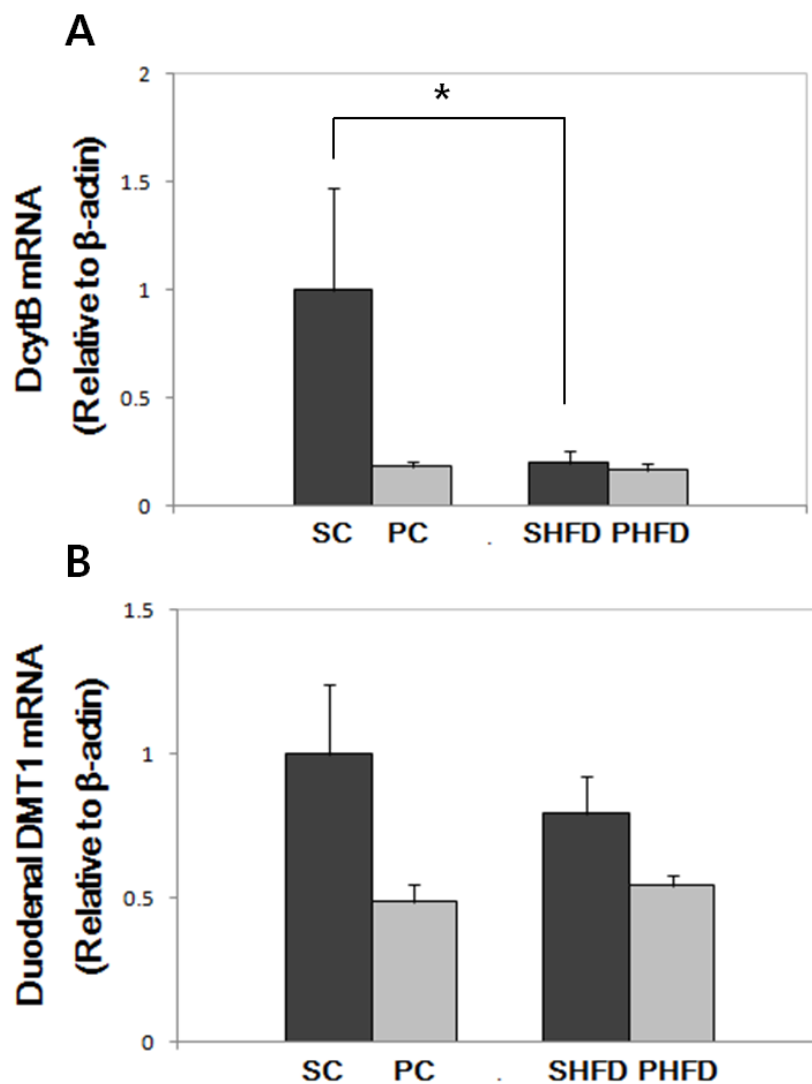
## 5. 고지방 식이로 유도한 비만이 장세포 내로의 철의 이동에 미치는 영향

비만이 철의 장세포 내로의 이동을 저해하는지 살펴보기 위해 장세포 내로의 철 유입에 관여하는 효소인 Dcytb 와 효소에 의해 환원된 철을 장세포 내로 운반하는 운반단백질인 DMT1 의 mRNA 수준을 십이지장에서 측정하였다.

Dcytb mRNA 수준은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 낮은 경향을 보였다. 그러나 지방 급원에 따른 군간 차이는 보이지 않았다. Dcytb mRNA 수준은 대두유 대조군에 비해 고지방 대두유군에서 유의적으로 낮았다. 이에 반해 잣기름 대조군의 Dcytb mRNA 수준은 고지방식이군 수준으로 낮아, 잣기름 대조군과 고지방 잣기름군간의 유의적 차이를 보이지 않았다 (Figure 9A).

십이지장의 DMT1 mRNA 수준은 지방 함량에 따른 그룹간 유의적 차이를 보이지 않았다. 하지만 DMT1 의 mRNA 수준은 대두유군에 비해 잣기름 군에서 낮은 경향을 보였다 (Figure 9B).



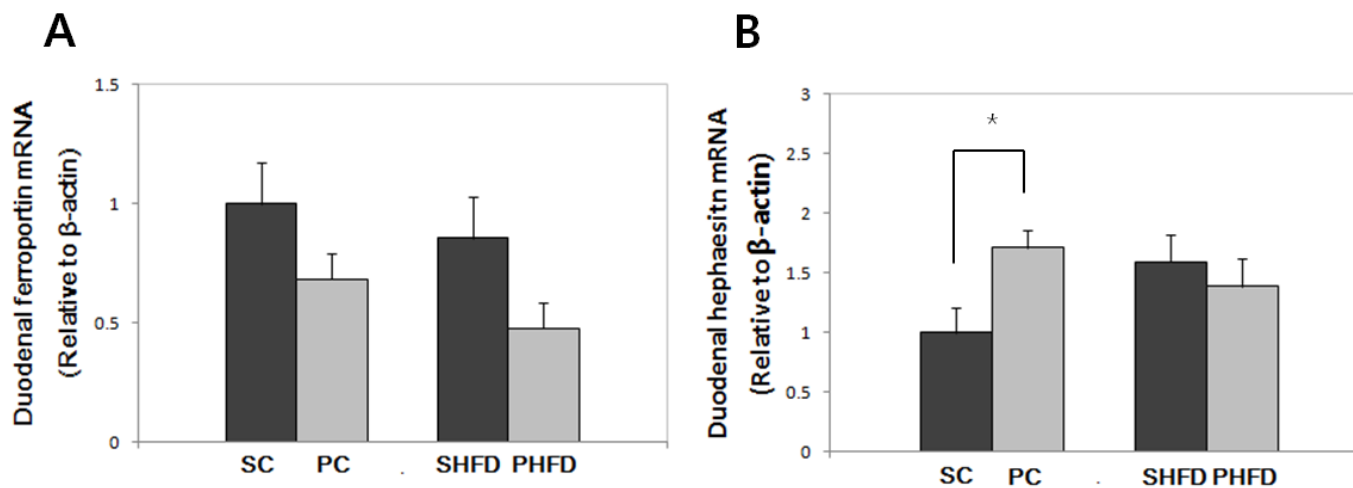


**Figure 9.** Duodenal Dcytb (A) DMT1(B) mRNA levels in mice fed control or high fat diets containing pine nut oil or soybean oil. Values represent the relative amount of target mRNA compared to  $\beta$ -actin mRNA. Statistical difference was determined by Kruskal wallis test followed by Mann Whitney *U*-test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6 per group).

## 6. 고지방 식이로 유도한 비만이 장세포에서 혈중으로의 철의 이동에 미치는 영향

비만이 장세포에서 혈중으로의 철의 이동을 저해하는지 알아보기 위해 운반 단백질인 ferroportin 과 ferroportin 에 의해 운반된 철이 apo-transferrin 에 결합하기 위해 필요한 철의 산화과정을 매개하는 효소인 hephaestin 의 mRNA 수준을 십이지장에서 측정하였다.

Ferroportin mRNA 수준은 지방함량에 따른 그룹간 유의적 차이를 보이지 않았다. 그러나 대두유군에 비해 잣기름군에서 ferroportin 의 mRNA 수준이 유의적으로 낮았다 (Figure 10A). Hephastin 의 mRNA 수준은 지방함량 및 지방 급원에 따른 그룹간 차이를 보이지 않았다. 하지만 지방함량과 지방 급원의 상호작용 효과가 유의적이었다. 대두유 대조군에 비해 잣기름 대조군에서 hephaestin 수준이 유의적으로 높았다 (Figure 10B).



Fat amount ( <i>P</i> value)	0.24	0.52
Oil type ( <i>P</i> value)	0.03	0.23
Interaction ( <i>P</i> value)	0.82	0.04

**Figure 10.** Duodenal ferroportin (A) and hephaestin (B) mRNA levels in mice fed control or high fat diets containing pine nut oil or soybean oil. Values represent the relative amount of target mRNA compared to  $\beta$ -actin mRNA. Two-way ANOVA was used to determine the effects of fat amount and oil type and was followed by an LSD post-hoc test. Student's *t* test was used for comparison between PC and SC groups or PHFD and SHFD groups if the interaction was significant (\*,  $P < 0.05$ ). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6 per group).

## V. 고찰

고지방 식이로 유도한 비만 모델에서 간의 철 저장량이 유의적으로 낮았다. 이에 반해 또 다른 2 가 양이온인 구리와 아연의 농도는 그룹 간 차이를 보이지 않았다. 비만에 의한 간의 철 저장량 감소는 선행 연구의 결과와 일치했다(Chung et al. 2011). 본 연구에서는 대조군에 비해 고지방 식이군에서 간의 철 저장량이 약 25% 정도 낮았다. 하지만 선행연구의 경우, 간의 철 저장량이 저지방 식이군에 비해 고지방 식이군에서 약 70% 정도 낮았다. 이러한 차이는 두 연구의 실험식이 내 지방함량과 사육기간의 차이에서 기인한 것으로 보인다. 선행연구의 경우, 총 열량의 60%를 지방으로부터 공급하며 16 주간 사육하였지만, 본 연구는 총 열량의 45%를 지방으로부터 공급하였으며 12 주간 사육하였다. 이로 인해 본 연구에서는 대조군과 고지방 식이군간의 체중 증가량 차이가 약 6 g 이었지만, 선행 연구에서는 약 14 g 이었다(Chung et al. 2011). 또한 체중 증가량과 간의 철 농도 간에는 유의적인 음의 상관관계가 나타났다 ( $r=-0.621$ ,  $P<0.001$ ). 대조군과 고지방 식이군의 체중증가량과 철 농도간의

상관관계를 고려해 볼 때, 1 g 의 체중 증가량 차이는 간의 철 농도를 6 ug/g wet tissue 감소시키는 것으로 사료된다.

체중 증가량은 고지방 대두유군에 비해 고지방 찹기름군에서 유의적으로 낮았다. 그러나 찹기름으로 유도된 체중 감소 효과가 비만에 의한 간의 철 저장량 감소를 개선하지는 못했다. 선행연구의 경우, 고지방 식이군과 대조군간의 체중 증가량 차이는 13.7 g 이었다(Chung et al. 2011). 본 연구에서는 고지방 대두유군과 대두유 대조군간의 체중 증가량 차이는 6.2 g 이었다. 고지방 찹기름군과 찹기름 대조군간의 체중 증가량 차이는 4 g 이었고, 이 체중 증가량 차이가 비만에 의한 간의 저장 철 감소를 개선시키기에는 부족했던 것으로 사료된다.

간의 구리와 아연 농도는 그룹 간 차이를 보이지 않았다. 이는 철과 달리, 비만이 간의 구리와 아연 농도에는 영향을 미치지 못했음을 시사한다. 구리와 아연은 철과 일부 흡수경로를 공유하는 것으로 알려져 있다. 특히 구리와 아연은 장세포 내로 철을 이동시키는데 관여하는 운반단백질인 DMT1 을 통해 철과 흡수경로를 공유한다고 보고되고 있다. Caco-2 cell 에 DMT1 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotides) 를 트랜스펙션(transfection)시켰을 때, 철과 구리의 세포 내로의

이동이 낮았다. 또한 Caco-2 cell 에 철을 먼저 처리했을 때, 처리하지 않은 경우에 비해 구리의 장세포 내로의 이동이 낮았다(Arredondo et al. 2003). DMT1 sh RNA 를 트랜스펙션시킨 Caco-2 cell 은 대조군에 비해 세포 내 아연 함량이 유의적으로 낮았다 (Espinoza et al. 2012). 본 연구에서 고지방 식이로 유도한 비만은 DMT1 의 mRNA 수준에 영향을 미치지 못했다. 그러므로 DMT1 mRNA 의 수준 차이는 고지방 식이군에서의 저장 철 감소를 설명할 수 없다. 비만으로 인한 간의 저장 철 저하 또한 DMT1 mRNA 수준에 영향을 미치지 못했다. 그러나 Sonnweber (Sonnweber et al. 2012) 등은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 DMT1 의 mRNA 수준이 유의적으로 높다고 보고하였다. 또한 고지방 식이군에 철을 보충한 경우, 보충하지 않은 군에 비해 DMT1 의 mRNA 수준이 유의적으로 낮다고 보고하였다. 이러한 상이한 결과가 나타난 것은 비만으로 인한 철 결핍 정도가 달라 나타난 것으로 보인다. 본 연구에서는 대조군에 비해 고지방 식이군에서 간의 철 농도가 약 25%정도 낮았지만, Sonnweber(Sonnweber et al. 2012) 등의 연구 결과에 따르면, 대조군에 비해 고지방 식이군에서 혈장 철 농도가 유의적으로 낮았다. 혈장 철 농도는 저장 철이 고갈된

이후에 감소하게 되므로 Sonnweber 등의 연구에서 대조군에 비해 고지방 식이군에서 혈장 철 농도가 유의적으로 감소하였다는 것은 본 연구의 고지방 식이군에 비해 심각하게 철 결핍이 유도되었다는 것으로 볼 수 있을 것이다. 즉, 본 연구의 고지방 식이군에서 나타난 철 영양상태 저하는 DMT1 의 mRNA 수준을 변화시킬 정도로 심하지 않았던 것으로 사료된다.

간에서의 hepcidin mRNA 수준은 그룹 간 차이를 보이지 않았다. 선행연구의 경우, 대조군에 비해 고지방 식이군에서 간에서의 hepcidin mRNA 수준이 유의적으로 낮았다. 하지만 hepcidin mRNA 수준을 간의 철 농도로 보정한 값은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 높았다. 이는 비만에 의해 유도된 만성 염증상태가 hepcidin mRNA 의 수준을 높였지만, 저장 철 감소로 인한 hepcidin 발현 억제 효과가 만성 염증에 의한 hepcidin 발현 촉진 효과를 상쇄시켜 전체적으로 hepcidin mRNA 수준을 감소한 것으로 사료된다(Chung et al. 2011). 체내 철 영양상태는 hepcidin 발현을 조절하는 대표적 요인 중 하나이다. 체내 철 요구량이 높아지거나 공급량이 줄어들면, 철의 흡수를 높이기 위해 hepcidin 발현이 감소된다(Nemeth et al. 2006; Darshan et al. 2009). 본 연구는 선행연구에 비해 고지방

식이군에서 간의 철 저장량의 감소가 심하지 않아 간의 hepcidin mRNA 수준이 그룹 간 차이를 보이지 않은 것으로 사료된다. 간의 hepcidin mRNA 수준이 그룹 간 차이를 보이지 않았던 것처럼 hepcidin 에 의해 번역 후 과정에서 조절되는 간과 십이지장에 위치한 ferroportin 의 단백질 발현 역시 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않았다. 따라서 고지방 식이군에서의 저장 철 감소는 hepcidin mRNA 수준의 변화에 의해 유발된 것이 아님을 시사한다.

철이 DMT1 에 의해 장세포 내로 운반되기 위해서는 Dcytb 에 의해 3 가 철 이온이 2 가 철 이온으로 환원되는 과정이 필요하다. 본 연구에서 Dcytb 의 mRNA 수준은 대두유 대조군에 비해 고지방 대두유군에서 유의적으로 낮았다. 이는 고지방 대두유군에서 철 흡수에 필수적인 3 가 철이온의 환원과정이 원활하게 이루어지지 않아 철의 장세포 내로의 이동이 저해되고 있음을 시사한다. Sonnweber 등의 연구에서도 고지방 식이군에서 Dcytb 의 mRNA 수준이 낮았다. 철을 보충했을 때, 대조군에 비해 고지방 식이군에서 Dcytb 의 발현이 유의적으로 낮았다(Sonnweber et al. 2012). 이는 철을 보충했을 때, 고지방 식이로 유도한 비만이 Dcytb 의 mRNA 수준을 낮추는데



기여한다는 것을 시사한다. 본 연구에서는 철의 보충이 없었음에도 불구하고, 대조군에 비해 고지방 식이군에서 Dcytb mRNA 수준이 유의적으로 낮았다. 이는 적절한 수준의 철이 공급되는 상황에서도 고지방 식이로 유도한 비만이 Dcytb 의 mRNA 수준을 현저히 낮출 수 있음을 시사한다. Dcytb 녹아웃(knockout)마우스에서 장세포 내로의 철 유입이 저해됐지만, 이러한 저해 효과를 상쇄시키기 위해 ferroportin 과 hephaestin 에 의한 장세포에서 혈류로의 철의 이동이 촉진되었다(McKie 2008). 본 연구에서는 대조군과 고지방 식이군 간의 ferroportin 과 hephaestin mRNA 의 수준에 유의적 차이가 없었다. 즉, 본 연구의 고지방 식이군에서는 Dcytb mRNA 수준 저하에 의한 보상기전이 작동하지 않아 철의 흡수가 저해된 것으로 사료된다. זאת기름 대조군은 고지방 식이군 수준으로 Dcytb mRNA 수준이 낮았다. 하지만 간의 철 농도는 대두유 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 hephaestin 의 mRNA 수준이 대두유 대조군에 비해 זאת기름 대조군에서 유의적으로 높은 것을 통해 설명 될 수 있다. ferroportin 에 의한 운반된 2 가 철이온이 apo-transferrin 에 전달되기 위해서는 hephaestin 에 의해 3 가 철로 산화되는 과정이 필수적이다. 장세포의 기저막

측(basolateral membrane)에 hephaestin 이 제대로 위치하지 못하는 결함을 가진 *sla* 마우스의 경우, 철 흡수가 현저하게 낮았다(Steele et al. 2005). 잣기름 대조군에서 Dcytb 의 mRNA 수준이 낮아 나타난 철 흡수 저해 효과는 hephaestin 의 mRNA 수준이 높아 상쇄된 것으로 보인다.

간의 구리 농도는 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않았다. 하지만 간의 총 구리 함량을 최종 체중으로 보정한 값은 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 낮았다. 이는 고지방 식이로 유도한 비만이 구리의 영양상태에 영향을 줄 수 있음을 보여준다. 대조군과 고지방 식이군간의 이러한 차이는 그룹간 Dcytb mRNA 수준의 차이와 연관이 있는 것으로 보인다. 구리는 철과 마찬가지로 흡수 시 2 가 구리 이온이 1 가 구리 이온으로 환원되는 과정이 필요하며 이 반응 또한 Dcytb 가 매개한다(Collins et al. 2010). Dcytb 를 발현하는 MDCK 세포는 Dcytb 유전자를 트랜스펙션 시키지 않은 MDCK 세포에 비해 구리 환원력이 유의적으로 높았다(Wyman et al. 2008). 그러므로 고지방 식이군에서의 낮은 Dcytb mRNA 수준은 구리의 흡수를 약간 저해시킨 것으로 보인다. 철, 구리와 달리, 아연은 별도의 환원과정이 없이 ZIP4 에 의해 장세포 내로 이동한다(Liuzzi et al.

2004). 이처럼 아연의 흡수과정은 Dcytb 의 작용에 영향을 받지 않으므로 간의 아연농도와 간의 총 아연 함량을 최종 체중으로 보정한 값은 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않은 것으로 사료된다.

십이지장의 DMT1 mRNA 수준은 대두유군에 비해 잣기름군에서 낮은 경향을 보였다. 하지만 잣기름군에서의 이러한 경향은 간의 철 농도에는 영향을 미치지 않았다. 십이지장의 ferroportin mRNA 수준은 지방 함량에 따른 그룹간 유의적 차이를 보이지 않았다. 이는 ferroportin mRNA 의 수준 차이가 비만에 의한 철 흡수 저해를 설명하지 못함을 시사한다.

결론적으로 고지방식으로 유도한 비만은 간의 철 농도 저하를 유발했다. 이에 반해 간의 구리, 아연 농도는 비만에 의해 영향을 받지 못했다. 고지방식으로 유도한 비만에서 간의 철 저장량이 낮은 것은 hepcidin mRNA 수준의 변화에 의한 것이라기 보다 낮은 Dcytb mRNA 수준에 의해 나타난 것으로 보인다. 간의 구리 함량을 최종체중으로 보정한 값은 고지방식이군에서 유의적으로 낮았다. 이는 보다 심각한 비만이 유도될 경우, 낮은 Dcytb mRNA 의 수준에 영향을 받아 간의 구리 농도 역시 낮아질 가능성이 있음을 시사한다. 고지방 식이군에서

식이지방의 일부를 잣기름으로 대체했을 때 유의적으로 낮은 체중  
증가가 나타났지만, 그것이 철 영양상태를 개선시키지는 못했다.

## VI. 요약 및 결론

본 연구는 고지방 식이로 유도한 비만이 간의 철, 구리 및 아연의 함량에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 또한 철 흡수에 관여하는 호르몬, 효소 및 수송단백질의 발현을 비교 분석하여 비만에서 철의 흡수를 저해시키는 요인을 파악하고자 하였다. 주요 결과를 요약해보면 다음과 같다.

- 1) 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 높은 체중 증가를 보여주었으며, 고지방 대두유군에 비해 고지방 잣기름군에서 체중증가 정도가 유의적으로 낮았다.
- 2) 대조군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 간의 철 농도가 낮았으며, 간의 철 농도와 체중은 비교적 강한 음의 상관관계를 보였다. 간의 구리 및 아연 농도는 고지방 식이에 의한 차이를 보이지 않았으나, 간의 총 구리 함량을 12 주차 체중으로 보정한 결과, 고지방 식이군에서 유의적으로 낮았다. 잣기름 대체에 따른 간의 철 농도의 차이는 관찰되지 않았다.
- 3) 간의 hepcidin mRNA 수준은 고지방 식이군과 대조군간 차이가 나타나지 않았다. Hpcidin 에 의해 단백질 수준에서 조절되는 ferroportin 역시 단백질 수준에서 군간 차이가 나타나지 않았다.

4) 대조군에 비해 고지방 식이군에서 Dcytb mRNA 수준이 낮은 경향을 보였다. 하지만 잣기름 대조군의 Dcytb mRNA 수준은 고지방 식이군 수준으로 감소하였다.

이상의 결과를 통해 비만이 간의 철 저장량은 저하시키지만, 간의 구리와 아연의 농도에는 영향을 미치지 못했다. 하지만 보다 심각한 비만이 유도될 경우, 간의 구리 농도가 저하될 가능성을 보여주었다. 또한 식이지방의 일부를 잣기름으로 대체하였을 때, 체중 감소효과가 나타났지만 그것이 철 영양상태 개선으로 이어지지 않는 못했다. 비만으로 인한 만성 염증상태가 철 결핍의 원인일 것이라는 기존 견해와는 달리, 본 연구에서는 간 내 철 결핍이 나타나는데 기여한 주요한 요인은 식이지장에서 낮은 Dcytb mRNA 수준에 의한 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Amato A, Santoro N, Calabro P, Grandone A, Swinkels D, Perrone L and Del Giudice E M "Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children." International Journal of Obesity (2010). **34**(12): 1772-1774.
- Anderson G J, Frazer D M, McKie A T, Wilkins S J and Vulpe C D "The expression and regulation of the iron transport molecules hephaestin and IREG1." Cell biochemistry and biophysics (2002). **36**(2): 137-146.
- Anderson G J, Frazer D M and McLaren G D "Iron absorption and metabolism." Current opinion in gastroenterology (2009). **25**(2): 129-135.
- Arredondo M, Muñoz P, Mura C V and Núñez M T "DMT1, a physiologically relevant apical Cu<sup>1+</sup> transporter of intestinal cells." American Journal of Physiology-Cell Physiology (2003). **284**(6): C1525-C1530.
- Asset G, Staels B, Wolff R L, Baugé E, Madj Z, Fruchart J C and Dallongeville J "Effects of Pinus pinaster and Pinus koraiensis seed oil supplementation on lipoprotein metabolism in the rat." Lipids (1999). **34**(1): 39-44.
- Brasse-Lagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A and Beaumont C

"Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation." Gastroenterology (2011). **140**(4): 1261-1271. e1261.

Chen H, Huang G, Su T, Gao H, Attieh Z K, McKie A T, Anderson G J and Vulpe C D "Decreased hephaestin activity in the intestine of copper-deficient mice causes systemic iron deficiency." J Nutr (2006). **136**(5): 1236-1241.

Chung J, Kim M S and Han S N "Diet-induced obesity leads to decreased hepatic iron storage in mice." Nutrition Research (2011).

Collins J F, Prohaska J R and Knutson M D "Metabolic crossroads of iron and copper." Nutrition reviews (2010). **68**(3): 133-147.

Coyne D W "Hepcidin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target." Kidney international (2011). **80**(3): 240-244.

Darshan D and Anderson G J "Interacting signals in the control of hepcidin expression." Biometals (2009). **22**(1): 77-87.

Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, Loreal O, Brissot P, Borot N, Roth M and Coppin H "Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice." Gut (2002). **51**(5): 648-653.

Espinoza A, Le Blanc S, Olivares M, Pizarro F, Ruz M and Arredondo M "Iron, copper, and zinc transport: inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT1) and human copper transporter 1 (hCTR1) by



- shRNA." Biol Trace Elem Res (2012). 1-6.
- Fleming R E "Iron and inflammation: cross-talk between pathways regulating hepcidin." Journal of Molecular Medicine (2008). **86**(5): 491-494.
- Fuqua B K, Vulpe C D and Anderson G J "Intestinal iron absorption." Journal of Trace Elements in Medicine and Biology (2012).
- Ganz T and Nemeth E (2009). Iron sequestration and anemia of inflammation. Seminars in hematology, NIH Public Access.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, Gunshin Y, Romero M F, Boron W F, Nussberger S, Gollan J L and Hediger M A "Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter." Nature (1997). **388**(6641): 482-488.
- Haschke F, Ziegler E, Edwards B and Fomon S "Effect of iron fortification of infant formula on trace mineral absorption." Journal of pediatric gastroenterology and nutrition (1986). **5**(5): 768.
- Kennedy M L, Failla M L and Smith Jr J C "Influence of genetic obesity on tissue concentrations of zinc, copper, manganese and iron in mice." The Journal of nutrition (1986). **116**(8): 1432.
- Knutson M D "Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption." Annual review of nutrition (2010). **30**: 149-171.
- Lecube A, Carrera A, Losada E, Hernández C, Simó R and Mesa J "Iron deficiency in obese postmenopausal women." Obesity (2012).

**14**(10): 1724-1730.

Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L and Beutler E "Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6." Proc Natl Acad Sci U S A (2005). **102**(6): 1906-1910.

Liuzzi J P and Cousins R J "Mammalian zinc transporters." Annu. Rev. Nutr. (2004). **24**: 151-172.

Mackenzie B and Garrick M D "Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology (2005). **289**(6): G981-G986.

McClung J P and Karl J P "Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption." Nutrition reviews (2009). **67**(2): 100-104.

McKie A "The role of Dcytb in iron metabolism: an update." Biochemical Society Transactions (2008). **36**: 1239-1241.

Mena N P, Esparza A, Tapia V, Valdés P and Núñez M T "Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology (2008). **294**(1): G192-G198.

Moayeri H, Bidad K, Zadhoush S, Gholami N and Anari S "Increasing prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents (Tehran Adolescent Obesity Study)." European journal of pediatrics (2006). **165**(11): 813-814.

Nemeth E and Ganz T "Regulation of iron metabolism by hepcidin." Annu. Rev. Nutr. (2006). **26**: 323-342.

OUCHI N, OHASHI K, SHIBATA R and MUROHARA T "Adipocytokines and obesity-linked disorders." Nagoya Journal of Medical Science (2012). **74**(1-2): 19-30.

Pasman W J, Heimerikx J, Rubingh C M, Van Den Berg R, O'Shea M, Gambelli L, Hendriks H, Einerhand A, Scott C and Keizer H G "The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women." Lipids Health Dis (2008). **7**(10).

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P and Loréal O "A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload." Journal of Biological Chemistry (2001). **276**(11): 7811-7819.

Solomons N W and Jacob R "Studies on the bioavailability of zinc in humans: effects of heme and nonheme iron on the absorption of zinc." Am J Clin Nutr (1981). **34**(4): 475-482.

Solomons N W and Jacob R "Studies on the bioavailability of zinc in humans: effects of heme and nonheme iron on the absorption of zinc." The American journal of clinical nutrition (1981). **34**(4): 475-482.

- Sonnweber T, Ress C, Nairz M, Theurl I, Schroll A, Murphy A T, Wroblewski V, Witcher D R, Moser P and Ebenbichler C F "High-fat diet causes iron deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption." J Nutr Biochem (2012).
- Steele T M, Frazer D M and Anderson G J "Systemic regulation of intestinal iron absorption." Iubmb Life (2005). **57**(7): 499-503.
- Tussing-Humphreys L, Pustacioglu C, Nemeth E and Braunschweig C "Rethinking Iron Regulation and Assessment in Iron Deficiency, Anemia of Chronic Disease, and Obesity: Introducing Hepcidin." Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics (2012). **112**(3): 391-400.
- Vokurka M, Krijt J, Sulc K and Necas E "Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis." Physiological Research (2006). **55**(6): 667.
- Wang J and Pantopoulos K "Regulation of cellular iron metabolism." Biochemical Journal (2011). **434**(Pt 3): 365.
- Wilrike P, Jos H, Carina R, Henk H, Alexandra E, Corey S, Hiskias K and Louise M "The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women." (2008).
- Wyman S, Simpson R J, McKie A T and Sharp P A "Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro." FEBS

letters (2008). **582**(13): 1901-1906.

Yadrick M, Kenney M and Winterfeldt E "Iron, copper, and zinc status: response to supplementation with zinc or zinc and iron in adult females." Am J Clin Nutr (1989). **49**(1): 145-150.

## **Abstract**

### **Effects of high fat diet-induced obesity on the hepatic iron, copper and zinc status and the expression of iron absorption-related genes in mouse**

Yeseo Lim

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Obesity is associated with iron deficiency. However, it has not been examined whether other divalent cations such as copper and zinc can be influenced by diet-induced obesity. The underlying mechanisms of obesity-related dysregulation in iron status are not fully understood. Five-week-old male C57BL/6 mice were fed for 12 weeks with a control diet containing pine nut oil (10% calorie from PNO, PC) or soybean oil (10% calorie from SBO, SC) or a high fat diet containing PNO (10% calorie from PNO + 35% from lard, PHFD) or SBO (10% calorie from SBO +35% calorie from lard, SHFD). PHFD group gained significantly less body weight compared with the SHFD group (21.48 in SHFD, n=11 vs 17.53 in PHFD, n=11;  $P < 0.05$ ).

Hepatic iron content was significantly lower in the HFD group than the control group ( $P<0.001$ ). There was no significant difference in hepatic iron content between PHFD and SHFD groups despite a lower body weight in PHFD group. Hepatic copper and zinc content did not differ among groups. However, hepatic copper corrected for body weight was significantly lower in HFD groups compared with the control groups. Expression levels of hepatic hepcidin mRNA did not differ among groups. There was no difference in duodenal ferroportin protein expression level among groups but, Dcytb mRNA expression tended to be lower in HFD groups compared with the control groups ( $P=0.057$ ). In conclusion, high fat diet induced obesity led to decreased hepatic iron storage, while there was no significant impact on copper and zinc status. Lower weight gain in PHFD group did not improve iron status. Decreased expression of Dcytb seemed to contribute to a lower hepatic iron status in diet-induced obese mice.

## **Keywords**

Obesity, trace mineral status, Dcytb, iron absorption-related genes, high-fat diet

**Student number: 2010-23614**